WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7:

C12Q 1/68

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 00/58505

A1

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

5. Oktober 2000 (05.10.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/07127

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. September 1999

(27.09.99)

(30) Prioritätsdaten:

199 15 141.5

26. März 1999 (26.03.99)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ARTUS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK UND ENTWICKLUNG MBH [DE/DE]; Gerstäckerstrasse 9, D-20459 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRUPP, Guido [DE/DE]; Wannseebogen 30A, D-24111 Kiel (DE).
- (74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, D-22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: DETECTION OF NUCLEIC ACID AMPLIFIED PRODUCTS

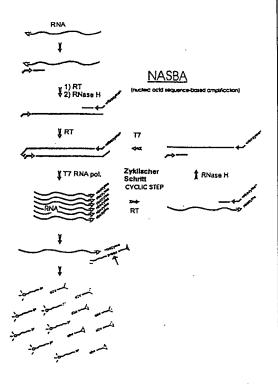
(54) Bezeichnung: DETEKTION VON NUKLEINSÄURE-AMPLIFIKATEN

(57) Abstract

The invention especially relates to methods for the amplification and quantitative real time detection of nucleic acids and to kits for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco ·	TD	Tschad
Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
Belgien	GN .	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
Brasilien	lL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
Kamerun		Korea	PL	Polen		
China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
Estland	LR	Liberia -	SG	Singapur		
	Armenien Österreich Australien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien Burkina Faso Bulgarien Benin Brasilien Belarus Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerun China Kuba Tschechische Republik Deutschland Danemark	Armenien FI Osterreich FR Australien GA Ascrbaidschan GB Bosnien-Herzegowina GE Barbados GH Belgien GN Burkina Faso GR Burkina Faso HU Benin IE Brasilien IL Belarus IS Kanada IT Zentralafrikanische Republik JP Kongo KE Schweiz KG Cète d'Ivoire KP Kamerun China KR Kuba KZ Tschechische Republik LC Deutschiland LI Dänemark LK	Armenien FI Finnland Österreich FR Frankreich Australien GA Gabun Ascrbaidschan GB Vereinigtes Königreich Bosnien-Herzegowina GE Georgien Barbados GH Ghana Belgien GN Guinea Burkina Faso GR Griechenland Bulgarien HU Ungarn Benin IE Irland Brasilien IL Israel Belarus IS Island Kanada I'T Italien Zentralafrikanische Republik JP Japan Kongo KE Kenia Schweiz KG Kirgisistan Cète d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik Kamerun China KR Republik Korea Kuba KZ Kasachstan Tschechische Republik LC St. Lucia Deutschland LI Liechtenstein Dänemark LK Sri Lanka	Armenien FI Finnland LT Osterreich FR Prankreich LU Australien GA Gabun Ascrbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Barbados GH Ghana MG Belgien GN Guinea MK Burkina Faso GR Griechenland Bulgarien HU Ungarm ML Benin IE Irland MN Brasilien IL Israel MR Belarus IS Island MW Kanada IT Italien MX Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Kongo KE Kenia NL Schweiz KG Kirgisistan NO Cète d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Kamerun Korea PL China KR Republik Korea PT Kuba KZ Kasachstan RO Tschechische Republik LC St. Lucia RU Deutschland LI Liechtenstein SD Dänemark LK Sri Lanka SE	Armenien FI Finnland LT Litauen Osterreich FR Frankreich LU Luxemburg Australien GA Gabun LV Lettland Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Republik Moldau Barbados GH Ghana MG Madagaskar Belgien GN Guinca MK Die ehemalige jugoslawische Burkina Faso GR Griechenland Republik Mazedonien Bulgarien HU Ungarn ML Mali Benin IE Irland MN Mongolei Brasilien IL Israel MR Mauretanien Belarus IS Island MW Malawi Kanada IT Italien MX Mexiko Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Niger Kongo KE Kenia NL Niederlande Schweiz KG Kirgisistan NO Norwegen Côte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Kamerun Korea PL Polen China KR Republik Korea PL Polen China KR Republik Korea PT Portugal Kuba KZ Kasachstan RO Rumänien Tschechische Republik LC St. Lucia RU Russische Pöderation Deutschland LI Liechtenstein SD Sudan Dänemark LK Sri Lanka SE Schweden	Armenien FI Finnland LT Litauen SK Osterreich FR Prankreich LU Luxemburg SN Australien GA Gabun LV Lettland SZ Aserbaidschan GB Vereinigtes Königreich MC Monaco TD Bosnien-Herzegowina GE Georgien MD Republik Moldau TG Barbados GH Ghana MG Madagaskar TJ Belgien GN Guinea MK Die ehemalige jugoslawische TM Burkina Faso GR Griechenland Republik Mazedonien TR Bulgarien HU Ungarn ML Mali TT Benin IE Irland MN Mongolei UA Brasilien IL Israel MR Mauretanien UG Belarus IS Island MW Malawi US Kanada IT Italien MX Mexiko Zentralafrikanische Republik JP Japan NE Niger UZ Kongo KE Kenia NL Niederlande VN Schweiz KG Kirgisistan NO Norwegen YU Côte d'Ivoire KP Demokratische Volksrepublik NZ Neuseeland ZW Kamerun KR Republik Korea PL Polen China KR Republik Korea PT Portugal Kuba KZ Kasachstan RO Rumänien Tschechische Republik LC St. Lucia RU Russische Pöderation Danemark LK Sri Lanka SE Schweden

WO 00/58505 PCT/EP99/07127

Detektion von Nukleinsäure-Amplifikaten

Die vorliegende Patentanmeldung betrifft insbesondere Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren sowie Kits zur Durchführung der Verfahren.

- 5 Zur Vervielfältigung von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) oder Ribonucleinsäuren (RNA) wurden bislang verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie zum Beispiel Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA®), entwickelt. Auf diesen Amplifikationstechniken basierende Assays werden beispielsweise für den hochsensitiven Nachweis und/oder die Quantifizierung von Erregern im medizinisch-diagnostischen Bereich eingesetzt.
- DNA-Amplifikationstechniken wie PCR führen zur Erzeugung großer
 15 Mengen amplifizierter Target-DNA (oder über einen initialen
 Reverse Transkriptase-Schritt zu amplifizierter RNA). Üblicherweise werden die Amplifikationsprodukte nach einer definierten
 Zeit mit Hilfe von Post-Amplifikationsmethoden im allgemeinen
 durch Hybridisierung nachgewiesen (Endpunktanalyse).
- Gemäß einem neuen Ansatz "TaqMan®" zur quantitativen PCR wird Fluorescence Resonance Transfer (FRET; vgl. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986-994) mit doppelt fluoreszenzmarkierten DNA-

Sonden zur Echtzeitdetektion der DNA-Amplifikation vorgeschlagen). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Sonde am Target haften bleibt, bis sie durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase entfernt wird. Die Stringenz ist aufgrund des 5 Temperaturprofils der PCR nur sehr schwer kontrollierbar, und die Lösung dieses Problems durch entsprechende Sondenkonstruktion ist nur unter großem Aufwand denkbar. Ein weiterer Nachteil des TaqMan[®] ist die Erzeugung eines äquimolaren Signals, d.h., daß pro Amplifikationszyklus nur ein Sondenmolekül pro amplifiziertem 10 DNA Target-Molekül gespalten wird, was ein vergleichsweise schwaches Signal zur Folge hat.

Bei NASBA® handelt es sich - im Gegensatz zur thermozyklischen PCR - um eine homogene, isotherme in vitro Amplifikation (vgl. 15 z.B. T. Kievits et al, J. Vir. Meth. 35 (1991) 273-286), EP 0 329 822 sowie R. Sooknanan et al. in "Molecular Methods for Virus Detection", D.L. Wiedbrauk und D.H. Farkas (Ed.), Academic Press 1995, Kapitel 12, 261-285). Gegenüber anderen Amplifikationsverfahren weisen die NASBA® und andere isotherme Reaktionen den 20 Vorteil auf, daß sie ohne besonderen technischen Aufwand durchgeführt werden können, da die Amplifikation bei einem einzigen Temperaturwert erfolgt und diese Reaktionsbedingungen während des gesamten Prozesses beibehalten werden. Damit verkürzt nicht auch die Dauer jedes Amplifikationsschrittes. In Verbindung 25 mit der z.B. im Vergleich zur PCR hohen Amplifikationseffizienz werden so mit Hilfe der NASBA® und anderer isothermer Amplifikationstechniken hohe Amplifikat-Konzentrationen in kurzer Zeit erreicht. Ein weiterer Vorteil der NASBA® gegenüber der PCR ergibt sich aus der selektiven Nachweismöglichkeit von RNA. Dies 30 spielt insbesondere im Zusammenhang mit der Amplifikation bzw. Ouantifizierung von zellulärer mRNA eine Rolle, bei der mögliche zelluläre DNA-Kontaminationen vermieden werden können.

Ein Nachteil der NASBA[®] und anderer isothermer Amplifikations-35 strategien ist jedoch, daß eine Echtzeitdeketion mit Hilfe von Fluoreszenz wie bei dem auf PCR basierenden TaqMan[®] (Perkin Elmer) oder Light-Cycler (Roche Diagnostics) nicht möglich ist. Die in diesem Zusammenhang vorgeschlagene Endpunktanalyse zur Quantifizierung ist mit Schwierigkeiten verbunden, da im Falle des Nachweises untreschiedlicher Target-RNA-Konzentrationen manche Proben bereits das Sättigungsniveau (Plateauphase) 5 erreicht haben können, während sich andere Proben noch in der Phase steigender Amplifikat-Konzentrationen befinden (vgl. auch Heid et al., a.a.O.). Ferner ist diese Endpunktsanalyse aufgrund zusätzlicher Arbeitsschritte nach der erfolgten RNA-Amplifikation aufwendiger und zeitintensiver. Aufgrund des Erfordernisses, die 10 Reaktionsgefäße für die Quantifizierungsschritte zu öffnen, besteht außerdem das Risiko einer Kreuzkontamination hochamplifizierter RNA- und DNA-Targets.

Von Leone et al. (Nucleic Acids Research 26 (1998) 2150-2155)

15 wurde ein Ansatz zur Echtzeitdetektion von NASBA®-amplifizierter RNA vorgeschlagen, bei dem man eine zweifach fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde verwendet. Im Gegensatz zum PCR-Verfahren (vgl. Heid et al., a.a.O.) haftet die Sonde am Target an und wird bei der Amplifikationsreaktion nicht entfernt. Dies führt zu potentiellen 20 Komplikationen, da die DNA-Sonden während der frühen Amplifikationsstufen mit der Bindung an die ersten Antisense-RNA-Amplifikate interferieren können, was zum RNase H-Abbau und damit zu Eliminierung von RNA-Substraten und in der Folge zu einer fehlerhaften Konzentrationsbestimmung führen kann. Die Genauigkeit der quantitativen Target-Bestimmung hängt ferner in entscheidendem Maß von der Menge der zugesetzten Sonde ab.

Das von Leone et al. vorgeschlagene System erlaubt allerdings nur eine sehr schlechte Quantifizierung, unabhängig davon, ob man die 30 bevorzugte Auswertung auf Basis des Schwellenwerts (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 100 fg und 1 pg überlappen zu Beginn) oder nach Erreichen des Plateaus (vgl. Leone et al., Figur 7; Kurven für 1 pg und 10 pg überlappen am Ende) durchführt.

35 Ferner ist nur eine sehr geringe Stringenz möglich, da die Sonde am Target haften bleibt und die isotherme Reaktion bei relativ geringer Temperatur (41°C) erfolgt, was ein hohes Risiko falsch

positiver Ergebnisse zur Folge hat. Offensichtlich könnte, abhängig von der Sonde, ein maximales Signal sogar bei geringeren Temperaturen erhalten werden (vgl. Leone et al., Figur 7), aber aufgrund der gewählten Versuchsdurchführung hätte dies ein zusätzliches Risiko für falsch positive Resultate zur Folge. Wie im Rahmen weiterer Untersuchungen anhand des von Leone et al. vorgeschlagenen Protokolls festgestellt wurde, variiert die optimale Temperatur für die Hybridiserung des Fluoreszenzmarkers in Abhängigkeit von der Länge bzw. der Sequenz des hybridi-10 sierenden Target-Abschnitts.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, insbesondere von RNA, zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile der im Stand der 15 Technik bekannten Methoden, insbesondere des Verfahrens von Leone et al., vermeidet und für Routineanwendungen geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, bei dem man

20

- 25 a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
- 30 b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man

die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

Crel. = tp / tRef.,

wobei

10

5

 t_{P} der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

- $t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.
- 20 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, das aufgrund des über den Primer eingeführten bzw. an die Nukleinsäureamplifikate angehängten Sequenzmotivs A und des in der Sonde verwendeten Motivs B die Bildung eines Hammerkopf-Ribozyms ermöglicht, kommt es zur Spaltung der Sonde und damit zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Das erfindungsgemäße Prinzip ist schematisch in Fig. 1 (sowie Fig. 2 bis 16) dargestellt. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich möglich, Sequenzen auszunutzen, die anstelle des Hammerkopf-Ribozyms zur Ausbildung anderer, kleinerer Ribozyme (z.B. des "Hairpin-Ribozyms" oder des "Hepatitis Delta") 30 geeignet sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Quantifizierung von RNA, DNA oder RNA/DNA-Chimären (d.h. Ribound Desoxyribonukleotiden enthaltenden Nukleinsäuren), die als "Target-Nukleinsäure" bezeichnet werden, wobei gegebenenfalls eine dem Verfahren vorgeschaltete Aufschmelzung doppelsträngiger Nukleinsäuren zum Erhalt von Einzelsträngen erforderlich ist. Bei den im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeigneten Amplifikationsverfahren handelt es sich vorzugsweise um um isotherme Amplifikationsverfahren wie NASBA[®], Transcription Mediated Amplification (TMA; vgl. z.B. M. Hirose et al., J. Clin. 5 Microbiol. 36 (1998) 3122-6) oder Self-sustained Sequence Replication (3SR; vgl. E. Fahy et al. in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991, 25-33) oder um cyclische Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR.

- 10 Soweit hierin nichts anderes angegeben ist kann es sich bei den Nukleotiden A, C und G jeweils um Ribonukleotide (rNTP) oder Desoxyribonukleotide (dNTP) handeln. "N" kann für ein beliebiges Ribo- oder Desoxyribonukleotid stehen. Im Falle von RNA/DNA-Chimären (d.h. Oligonukleotiden, die sowohl Ribo- als auch Desox-15 yribonukleotide enthalten) sind die obligatorischen Ribonukleotide mit dem Präfix "r" versehen (d.h. rA, rC, rG) bzw. U. Die Sequenzmotive A und B der Sonden können somit entweder ausschließlich aus Ribonukleotiden (RNA-Sonde) bestehen oder RNA/DNA-Chimare sein. Beim Motiv A ist es jedoch erforderlich, 20 daß am 3'-Ende in jedem Fall das Ribonukleotid Adenin (rA) eingesetzt wird (d.h. 5'-GAA(rA)-3'). Beim Motiv B (5'-CUGANGA-3') ist es erforderlich, daß Guanin als Ribonukleotid vorliegt und Adenin am 3'-Ende ebenfalls ein Ribonukleotid (rA) ist (d.h. 5'-CU(rG)AN(rG)(rA)-3'). U kann gegebenenfalls durch T ausge-25 tauscht sein.
- Unter "Fluoreszenz-Schwellenwert" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenz-Wert verstanden, der um den Faktor 5-10 über der unter vergleichbaren Bedingungen (d.h. Reaktionsmischung ohne Target- oder Referenz-Nukleinsäure) gemessenen Hintergrundschwankung liegt.

Die Zeit tp entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis soviele Amplifikate der 35 Target-Nukleinsäure gebildet sind, daß der Fluoreszent-Schwellenwert (Schwellenwert) erreicht ist.

Die Zeit t_{Ref.} entspricht derjenigen Zeit, die nach Start der Amplifikationsreaktion vergeht, bis ausgehend von einer Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration soviele Amplifikate gebildet sind, daß der Schwellenwert erreicht ist. Die Referenznukleinsäu5 re sollte in ihrer Nukleinsäuresequenz nur geringfügig von der Target-Nukleinsäuresequenz abweichen, damit eine möglichst genaue Ouantifizierung erreicht wird.

Um die Konzentration der Target-Nukleinsäure möglichst exakt 10 bestimmen zu können mißt man vorzugsweise mehrere t_{Ref} .-Werte für Referenz-Nukleinsäuren unterschiedlicher Konzentration, so daß der gemessene t_p -Wert möglichst zwischen zwei t_{Ref} .-Meßpunkten liegt und somit eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann. Vorzugsweise mißt man drei t_{Ref} .-Werte für eine Referenz-15 Nukleinsäure bei drei unterschiedlichen Konzentrationen und ermittelt die sich daraus ergebende Meßkurve (Eichkurve). Die Target-Nukleinsäure unbekannter Konzentration kann anschließend durch Bestimmung des t_p -Wertes durch Vergleich mit der Eichkurve bestimmt werden.

20

- Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird das Verfahren durchgeführt, indem man die Target-Nukleinsäure in gleichzeitiger Anwesenheit einer oder mehrerer, vorzugsweise von drei Referenz-Nukleinsäuren bekannter Konzentration durchführt, und zur Detektion verschiedene sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal erzeugen. Die Sequenzen der Referenz-Nukleinsäuren in einem Amplifikationsansatz unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und sollten Varianten der Target-Nukleinsäure sein.

 30 Auf diese Weise können in einem Reaktionsansatz die tp- und tRef.
- Werte gleichzeitig bestimmt und somit ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand die Konzentration ($c_{\rm rel.}$) der Target-Nukleinsäure bestimmt werden (sogen. "Multiplexing"; vgl. auch US 5,837,501).
- 35 Anstelle der Verwendung eines das Sequenzmotiv A enthaltenen Primers und einer das Sequenzmotiv B enthaltenden Sonde ist auch die umgekehrte Kombination gleichermaßen geeignet, d.h. die

Kombination aus einem das Motiv B enthaltenden Primer und einer das Motiv A enthaltenden Sonde.

Als Reporter kommen praktisch alle Fluoreszenz-Farbstoffe und 5 insbesondere die in Tab. III angegebenen Farbstoffe (vor allem FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue (TIB MOLBIOL) in Frage. Vorzugsweise handelt es sich bei den Reporter-Farbstofen um Substanzen mit hohem Fluoreszenzsignal (d.h. hoher "Lichtausbeute") bei geringem 10 "Photobleaching".

Als Quencher können Farbstoffe eingesetzt werden, die bei Wellenlängen > ca. 500 nm absorbieren. Unter den in Frage kommenden Substanzen sind TAMRA, LCR, CY-5 oder DABCYL bevorzugt.

15

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Reporter/Quencher-Kombinationen bevorzugt, die eine Anregung bei ca. 490 nm und eine Emission bei < ca. 650 nm (TaqMan[®] SDS 7700, Perkin Elmer) oder < 700 (Light Cycler, Boehringer) gestatten. Die Fluoreszenz 20 kann praktisch mit jedem handelsüblichen Fluorimeter gemessen werden.

Beim Multiplexing bietet sich die Kombination des universellen Quenchers DABCYL mit Reporter-Farbstoffen wie Coumarin (emit25 tierte Fluoreszenz bei 475 nm), FAM (emittierte Fluoreszenz bei 515 nm), BODIPY (emittierte Fluoreszenz bei 525 nm), TAMRA (emittierte Fluoreszenz bei 575 nm), Texas Red (emittierte Fluoreszenz bei 615 nm), CY-5 (emittierte Fluoreszenz bei 674 nm) usw. an (vgl. z.B. S. Tyagi et al., Nature Biotech. 16 (1998) 49-53).

30

Sollte die zu amplifizierende Nukleinsäure bereits die Sequenzmotive 5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3' ("Ribozym-Motive") enthalten, kann das Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion erfindungsgemäß ebenfalls durchgeführt werden, wobei - aufgrund des bereits in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motivs - unmarkierte Primer einsetzt werden, d.h. Primer, an die Motiv A oder Motiv B nicht angehängt sind. Die

Detektion erfolgt schließlich, indem man die NukleinsäureAmplifikation - vorzugsweise NASBA[®], TMA, 3SR oder PCR - in
Gegenwart eines Überschusses einer Sonde durchführt, die das
jeweils zum in der Target-Nukleinsäure enthaltenen Ribozym-Motiv
5 "komlementäre" Motiv enthält. Unter "komplementäres Motiv" wird
im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Motiv verstanden, das abhängig von dem in der Target-RNA enthaltenen Ribozym-Motivs
(5'-GAAA-3' oder 5'-CUGANGA-3') zur Ausbildung einer HammerkopfRibozym-Struktur (Hammerhead-Ribozym) erforderlich ist.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, bei dem man

15

- a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der für das Motiv A im Transkript kodiert, amplifiziert wird, wobei man
- b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
- 30 c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

35

wobei

5

10

 t_{P} der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

 $t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist somit erstmals eine quantitative Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren (d.h. RNA, DNA oder RNA-DNA-Chimären) im Rahmen einer isothermen Nukleinsäuream15 plifikation, z.B. mittels NASBA[®], TMA oder 3SR, möglich. Im Falle der NASBA[®] werden insbesondere die dem System von Leone et al. (a.a.O.) anhaftenden Probleme umgangen. Ferner kommt es nicht zu einer möglichen Konkurrenz zwischen Detektion und Amplifikation, da die Sonde - eine RNA-Substratsonde - nicht am Target haften 20 bleibt sondern abgespalten und freigesetzt wird, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt wird. Ferner ist von Vorteil, daß RNase H die Target-RNA im Hybrid aus RNA-Substratsonde und RNA-Target nicht abbauen kann. Ferner ist die Menge der RNA-Substratsonde nicht kritisch, und sie kann in einem sehr hohen 25 überschuß, wie z.B. 500 nM gegenüber 2 nM Ribozym-Target oder 0,066 nM Ribozym, eingesetzt werden.

Gegenüber den auf der PCR-basierenden Echtzeitverfahren wie TaqMan® oder Light Cycler® weist das erfindungsgemäße Verfahren 30 unter isothermen wie unter cyclischen Temperaturbedingungen (PCR) ebenfalls Vorteile auf. Aufgrund der Möglichkeit, im Rahmen eines Amplifikationsschrittes mehrere Sonden zu spalten, kann ein vergleichsweise höheres Signal generiert werden. Dieses führt zu einer höheren Sensitivität der Reaktion und zu einer verkürzten 35 Reaktionszeit. Zudem ist die Signalgenerierung aufgrund der enzymatischen Spaltung grundsätzlich steuerbar. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens liegt in der hohen Spezifi-

tät der Reaktion, da nur eine exakte Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zum Spaltungsprozeß und damit zum Entstehen eines signifikanten Signals führt. ferner ist insbesondere im Vergleich zum TaqMan[®] keine aufwendige Sondenkonstruktion notwendig, da sich die Sonde nach jedem Spaltungsprozeß von der Zielsequenz löst. Ein weiterer Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht in der Möglichkeit des Multiplexing

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt aufgrund der enzymatischen 10 Spaltung der Sonde eine sehr gute und exakte lineare Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Ribozym-System erzeugt die Hybridisierung selbst nur ein sehr schwaches Signal, während jedes in der amplifizierten Nukleinsäure vorhandene Ribozym eine Vielzahl von Nukleinsäure-Substratsonden spaltet. Diese weitere Amplifikation 15 ist sehr spezifisch und erfordert das Vorliegen einer vollständig hybridisierenden Sequenz (vgl. Singh et al., Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 6 (1996) 165-168). Ohne das Risiko, falsch positive Resultate zu erhalten, können Temperatur und sonstige Reaktionsbedingungen optimiert werden, um zu einem maximalen 20 Fluoreszenzsignal zu kommen. Beispielsweise können synthetische Peptide (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429), CTAB (Nedbal et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-7) oder GAP-DH (Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789) zugesetzt werden, die die Effizienz, wie z.B. die Hybridisierungsgeschwin-25 digkeit, und die Spezifität der Target-Erkennung erhöhen können.

Gegenüber den im Stand der Technik angewandten oder vorgeschlagenen Amplifikationsverfahren mit Target-Quantifizierung können durch die vorliegende Erfindung die Stabilität der RNA-Sonde 30 erhöht und deren Kosten gleichzeitig reduziert werden. So ist es z.B. möglich, nahezu alle, bei der chemischen Synthese teuereren Ribonukleotide durch 2'-Desoxyribonukleotide zu ersetzen, die billiger und gegenüber Abbau (durch längerfristige Lagerung, Einwirkung von Nukleasen, Metallionen wie Magnesium, sowie Hitze 35 usw.; vgl. Bratty et al., Biochim. Biophys. Acta 1216 (1993) 345-359) stabiler sind.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der allgemeinen Ribozym-Struktur und Effizienz des Verfahrens sind unter anderem folgende Modifikationen möglich:

5 Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen, d.h. um mehr Signale bezogen auf die Anzahl amplifizierter Nukleinsäure-Moleküle zu erzeugen, sollte auf den Spaltungsort des Ribozyms die Sequenz UA folgen (vgl. Clouet-d'Orval et al., Biochemistry 36 (1997) 9087-9092). Ferner sollte die Position X (vgl. Figur 4B) die 10 modifizierte Base Pyridin-4-on (vgl. Burgin et al., Biochemistry 35 (1996) 14090-14097) enthalten, was ebenfalls zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Detektionsstufe führt.

Durch das Ersetzen der meisten Ribonukleotide durch Desoxy15 ribonukleotide können die Kosten für eine RNA-Sonde um bis das
10fache gesenkt werden. An vier Positionen sind Ribonukleotide
jedoch essentiell, die z.B. in Fig. 2B, 4B, 15 und 16 mit "r"
gekennzeichnet sind (vgl. Byang et al., Biochemistry 31 (1992)
5005-5009). In den hierin vorhandenen Tabellen werden zur
20 Unterscheidung von Desoxy- und Ribonukleotiden ferner Großbuchstaben (für dNTPs) und Kleinbuchstaben (für rNTPs) verwendet.

Ferner hat sich gezeigt, daß chimäre DNA/RNA Hammerkopf-Ribozyme eine erhöhte katalytische Effizient und Stabilität aufweisen 25 (N.R. Taylor et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 4559-4565). Dieses Prinzip kann man erfindungsgemäß insbesondere für Amplifikationsverfahren wie z.B. PCR ausnutzen, die bei höheren Temperaturen oder bei cyclischen Temperaturprofilen durchgeführt werden.

30

Zusätze wie z.B. das Protein GAP-DH (vgl. Sioud et al., J. Mol. Biol. 257 (1996) 775-789), kurze synthetische Peptide, die vom Viral coat protein (vgl. Müller et al., J. Mol. Biol. 242 (1994) 422-429) abgeleitet sind oder die chemische Substanz CTAB (Netbal 35 et al., Biochemistry 36 (1997) 13552-13557) sind geeignet, die Effektivität des Verfahrens im Hinblick auf das Auffinden von in großen Nukleinsäure-Strukturen "versteckten" Targets, d.h.

Ribozym-Motiven, zu erhöhen.

Auf Basis der vorliegenden Erfindung ist es erstmals möglich, mehrere verschiedene Targets simultan durch Verwendung ent-5 sprechender Ribozym-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen nachzuweisen. Dabei sind Sequenz-spezifische Sonden erforderlich, die selektiv an den jeweils nachzuweisenden Target-Nukleinsäuren anhaften und bei Ribozym-Spaltung Fluoreszenz-Signale unterschiedlicher Wellenlänge erzeugen. Beispielsweise 10 ist es möglich, den Quencher DABCYL mit Reporter-Farbstoffen, wie z.B. Cumarin (Fluoreszenzemission bei 475 nm), FAM (Fluoreszenzemission bei 515 nm), BODIPY (Fluoreszenzemission bei 525 nm), TAMRA (Fluoreszenzemission bei 575 nm), Texas red (615 nm), CY-5 (674 nm) usw., zu kombinieren (vgl. Tyagi et al., Nature Biotech. 15 16 (1998) 49-53). Mit diesem sogenannten "Multiplexing" ist es somit möglich, innerhalb eines Reaktionsansatzes gleichzeitig eine Target-RNA sowie mehrere Referenzproben bekannter Konzentration, deren Sequenzen sich im Primer-bindenden Abschnitt jeweils geringfügig voneinander unterscheiden, zu amplifizieren, 20 wobei durch Sequenz-spezifische Sonden, die unterschiedliche Reporter/Quencher-Kombinationen tragen, eine Quantifizierung erfolgen kann, ohne daß getrennte Amplifikationen und Fluoreszenzmessungen mit den RNA-Referenzproben durchgeführt werden müssen.

25

35

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren, der entweder

- a) einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure30 Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40
 Nukleotiden, angehängt ist, die für das Sequenzmotiv
 5'-GAAA-3' (oder 5'-CUGANGA-3') im Transkript kodiert,
 - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
 - Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikationsreaktion,
 - d) eine Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50

Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls

 e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt,

oder

5

- 10 a) zwei Amplifikationsprimer,
 - b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
 - eine Nukleinsäure-Sonde vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (oder 5'-GAAA-3') enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
 - d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

20

15

umfaßt.

Gemäß einem Teilaspekt der vorliegenden Erfindung werden erstmals ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sowie Kits zur 25 Durchführung des Verfahrens zur Verfügung gestellt.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) oder das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man 30 eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide) in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-35 Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweisen muß und man die Nukleinsäure durch

Erhalt eines der Wahl der Reporter- und Quencher-Moleküle entsprechendes Fluoreszenzsignals nachweist.

Ein erfindungsgemäßer Kit zur Durchführung dieses Nachweisver5 fahrens umfaßt neben zur Durchführung der Reaktion erforderlichen
Lösungsmittel und Reagenzien eine Sonde, vorzugsweise mit einer
Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50
Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder
das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes
10 Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül
(s.o.) angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung
mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

Für den Fall, daß die Target-Nukleinsäuren keines der Sequenzmo15 tive A oder B enthalten, kann die Nukleinsäure nachgewiesen werden, indem eines der Motive z.B. durch Nukleinsäureamplifikation unter Verwendung eines oben genannten Primers eingeführt wird. Zur Detektion ist eine entsprechende doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (s.o.) erforderlich, die ein zur Ribozym-Bildung geeignetes Sequenzmotiv enthält.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits wird - mit oder ohne Einsatz einer Nukleinsäure-Amplifikation - eine neue Methode zum Erreger-Nachweis zur Verfügung gestellt. Wie im folgenden 25 angegeben enthält beispielsweise die 16S rRNA vieler Erreger-Spezies bereits natürlicherweise ein 5'-GAAA-3' Ribozym-Motiv, das zur Bildung des Hammerkopf-Ribozyms ausgenutzt werden kann. Falls die Nukleinsäuren der Erreger keine zur Ausbildung von Ribozymen geeignete Sequenzmotive enthalten können diese, wie 30 oben angegeben, im Rahmen der Amplifikationsstufen durch Verwendung entsprechender Primer eingeführt bzw. "addiert" werden.

Tab. I: GAAA in 16S rRNA

Region in E.coli 165 rRNA	70-100	115-145
E. coli		taatgtctggGAAActgcctgatg
Salmonella		taatgtctggGAAActgcctgatg
Staphylococcus		
C. perfringens	tttccttcggGAAAcggattagcg	
Vibrio	aagtegagegGAAAcgagttatet	taatgcctagGAAAttgccctgat
B.cereus		
C. botulinum		
Campylobacter		
Yersinia		taatgtctggGAAActgcctgatg
Listeria		

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
E. coli	ataactactgGAAAcggtagctaa	
Salmonella	ataactactgGAAAcggtggctaa	
Staphylococcus	ataacttcggGAAAccggagctaa	gttcaaaagtGAAAgacggtcttg
C. perfringens	atagccttccGAAAggaagattaa	tcataatgttGAAAgatggcatca
Vibrio	ataaccattgGAAAcgatggctaa	
B. cereus	ataactccggGAAAccggggctaa	cgcatggttcGAAAttGAAAggcg
C. botulinum	atagccttccGAAAggaagattaa	
Campylobacter	acancagttgGAAAcgactgctaa	gttgagtaggGAAAgtttttcggt
Yersinia	ataactactgGAAAcggtagctaa	
Listeria	ataactccggGAAAccggggctaa	ccacgcttttGAAAgatggtttcg

·		
Region in E. coli 16S rRNA	370-400	485-515
E. coli		
Salmonella		
Staphylococcus	cgcmatgggcGAAAgcctgacgga.	tacctaatcaGAAAgccacggcta
C. perfringens	agggtcattgGAAActgGAAAact	
Vibrio		
B. cereus	cgcaatggacGAAAgtctgacgga	tacctaaccaGAAAgccacggcta
C. botulinum	cgcaatggggGAAAccctgacgca	
Campylobacter	cgcaatggggGAAAccctgacgca	
Yersinia		
Listeria	cgcaatggacGAAAgtctgacgga	tatctaaccaGAAAgccacggcta

Region in E. coli 16S rRNA	595-625	625-655
E. coli	agtcagatgtGAAAtccccgggct	
Salmonella	agtcggatgtGAAAtccccgggct	#actgcattcGAAActggcaggct
Staphylococcus	agtctgatgtGAAAgcccacggct	agggtcattg GAAA ctg GAAA act
C. perfringens	agtgggatgtGAAAtacccgggct	
Vibrio	agtcagatgtGAAAgcccggggct	nattgcatttGAAActggcagact
B. cereus	agtctgatgtGAAAgcccacggct	agggtcattgGAAActgggagact
C. botulinum	agtgggatgtGAAAtccccgggct	
Campylobacter	agtotottgtGAAAtotaatggot	aactgcttggGAAActgatagtct
Yersinia	cagtcagatgtGAAAtccccgcgct	aactgcatttGAAActggcaagct
Listeria	agtotgatgtGAAAgcccccggct	agggtcattgGAAActggaagact

Region in E. coli 16S rRNA	650-680	660-690
E. coli		
Salmonella		
Staphylococcus	ttgGAAActgGAAAacttgagtgc	tgcagaagag GAAA gtggaattcc
C. perfringens		
Vibrio		
B. cereus		tgcagaagagGAAAgtggaattcc
C. botulinum		rgcaggagagGAAAgcggaattcc
Campylobacter		
Yersinia		
Listeria		

Region in E. coli 165 rRNA	685-715	755-780
E. coli	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgc GAAA gcgtggggag
Salmonella	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Staphylococcus	gtgtagcggtGAAAtgcgcagaga	gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
C. perfringens	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
Vibrio	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	
B. cereus	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	actgaggcgcGAAAgcgtggggag
C. botulinum	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	gctgaggcacGAAAgcgtgggtag
Campylobacter		gctaaggcgcGAAAgcgtggggag
Yersinia	gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga	gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Listeria	gtgtagcggtGAAAtgcgtagata	gctgaggcgcGAAAgcgtggggag

_	1	8	_

Region in E. coli 165 rRNA	895-925	1000-1050
E. coli		
Salmonella		
Staphylococcus	ccgcaaggttGAAActcaaaggaa	
C. perfringens		cttsstcgsgGAAAtccttcgggg
Vibrio		
B. cereus	ccgcaaggctGAAActcaaaggaa	
C. botulinum		
Campylobacter		
Yersinia		
Listeria	ccgcaaggttGAAActcaaaggaa	

Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
E. coli	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	
Salmonella	ctcgtgttgtGAAAtgtcgggtta	
Staphylococcus		assggcsgcGAAAccgcgsggtc
C. perfringens		
Vibrio	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	gccsacttgcGAAAgtgsgcgaat
B. cereus		
C. botulinum	 	
Campylobacter		
Yersinia	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	
Listeria		<u> </u>

Region in E. coli 16S rRNA	1305-1335
E. coli	
Salmonella	
Staphylococcus	
C. perfringens	attgtaggetGAAActegeetaca
Vibrio	
B. cereus	
C. botulinum	
Campylobacter	
Yersinia	
Listeria	

Tab. II: GAAA in 16S rRNA

	1 00, 10, 1	
Region in E. coli 16S rRNA	70-100	115-145
S. aureus		
S. epidermidis		
S. pneumoniae		
S. pyogenes		
E. faecalis	CactcaattgGAAAgaggagtggc	
N. meningitidis		
E. coli		taatgtctggGAAActgcctgatg "
Enterobacter spec.		taatgtctggGAAActgccgatgg
Proteus spec.	***	ggtaacaggaGAAAgcttgctttc
P. aeruginosa		
P. fluorescens		
P. mendocina		
P. syringae		
H. influenzae		ggtagcaggaGAAAgcttgctttc
H. ducreyi		
Bacteroides spec.		

Region in E. coli 16S rRNA	145-175	180-210
S. aureus	ataacttcggGAAAccggagctaa	gttcmaaagtGAAAgacggtcttg
S. epidermidis	ataacttcgg GAAA ccggagctaa	gttcaatagtGAAAgacggttttg
S. pneumoniae	ataactattgGAAAcgatagctaa	
S. pyogenes	ataactattg GAAA cgatagctaa	
E. faecalis	ataacacttgGAAAcaggtgctaa	gcataagagtGAAAggcgctttcg
N. meningitidis	ataactgatcGAAAgatcagctaa	tottgagagaGAAAgcaggggacc
E. coli	ataactactgGAAAcggtagctaa	
Enterobacter spec.	ataactactgGAAAcggtagctaa	
Proteus spec.	ataactactgGAAAcggtggctaa	
P. aeruginosa	ataacgtccgGAAAcggccgctaa	toctgagggaGAAAgtcggggatc
P. fluorescens	atsacgttcgGAAAcggacgctaa	tcctacgggaGAAAgcaggggacc
P. mendocina	atsacgttccGAAAggascgctaa	tcctacgggaGAAAgcangggacc
P. syringae	ataacgctcgGAAAcggacgctaa	tcctacgggaGAAAgcaggggacc
H. influenzae	ataactactgGAAAcggtagctaa	taaagggggcGAAAgctgttgcca
H. ducreyi	ataactarggGAAActgtagctaa	
Bacteroides spec.	atagcetttcGAAAGAAAgattaa	

Region in E. coli 165 rRNA	370-400	450-480
S. aureus	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	
S. epidermidis	cgcaatgggcGAAAgcctgacgga	
S. pneumoniae		tgtgagagtgGAAAgttcacactg
S. pyogenes		ggtgggagtgGAAAatccaccaag
E. faecalis	ggcaatggacGAAAgtctgaccga	
N. meningitidis		tgtcagggsaGAAAaggctgttgc
E. coli		
Enterobacter spec.		
Proteus spec.		
P. aeruginosa		
P. fluorescens	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	
P. mendocina	gacaatgggcGAAAgcctnatcca	
P. syringae	gacaatgggcGAAAgcctgatcca	
H. influenzae	cgcaatggggGAAAccctgatgca	
H. ducreyi	cacaatggggGAAAccctgatgca	
Bacteroides spec.		

Region in E. coli 16S rRNA	485-515	595-625
S. aureus	tacctaatcaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgcccacggct
S. epidermidis	tacctaatcaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgcccacggct
S. pneumoniae	tatcttaccaGAAAgggacggcta	
S. pyogenes	taactaaccaGAAAgggacggcta	
E. faecalis	tatctaaccaGAAAgccacggcta	agtctgatgtGAAAgcccccggct
N. meningitidis		agcaggatgtGAAAtccccgggct
E. coli		agtcagatgtGAAAtccccgggct
Enterobacter spec.		aagtcgatgtGAAAtccccgggct
Proteus spec.		agtcagatgtGAAAgccccgagct
P.aeruginosa		agcttgatgtGAAAtccccgggct
P. fluorescens		agttggatgtGAAAtccccgggct
P. mendocina		agttggatgtGAAAgccccgggct
P. syringae		agttgaatgtGAAAtccccgggct
H. influenzae		agtgaggtgtGAAAgccctgggct
H.ducreyi		agtgagatgtGAAAgccccgggct
Bacteroides spec.		agtcagttgtGAAAgtttgcggct

Region in E. coli 165 rRNA	625-655	650-680
S. aureus	agggtcattgGAAActgGAAAact	ttgGAAActgGAAAacttgagtgc
S. epidermidis	agggtcattgGAAActgGAAAact	ttgGAAActgGAAAacttgagtgc
S. pneumoniae	gtaggctttgGAAActgtttaact	
S. pyogenes	gtacgctttg GAAA ctggagaact	
E. faecalis	agggtcattgGAAActgggagact	
N. meningitidis		
E. coli		
Enterobacter spec.	aactgeattgGAAActggcagett	
Proteus spec.	aactgcatetGAAActggctggct	
P.aeruginosa		
P. fluorescens		
P. mendocina		
P. syringae		
H. influenzae		
H.ducreyi		
Bacteroides spec.	sattgeagttGAAActggeagtet	

Region in E. coli 16S rRNA	660-690	685-715
S. aureus	tgcagaagagGAAAgtggaattcc	gtgtagcggtGAAAtgcgcagaga
S. epidermidis	tgcagaagag GAAA gtggaattcc	gtgtagcggtGAAAtgcgcagaga
S. pneumoniae		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
S. pyogenes		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
E. faecalis		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
N. meningitidis		gtgtagcagt GAAA tgcgtagaga
E. coli		gtgtagcggt GAAA tgcgtagaga
Enterobacter spec.		gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga
Proteus spec.		gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga
P.aeruginosa		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
P. fluorescens		gtgtagyggtGAAAtgcgttgata
P. mendocina		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
P. syringae		gtgtagcggtGAAAtgcgtagata
H. influenzae		gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga
H.ducreyi		gtgtagcggtGAAAtgcgtagaga
Bacteroides spec.		gtgtagcggtGAAAtgcttagata

Region in E. coli 16S rRNA	715-745	755-780
S. aureus		gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
S. epidermidis		gctgatgtgcGAAAgcgtggggat
S. pneumoniae	caccggtggcGAAAgcggctctct	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
S. pyogenes	caccggtggcGAAAgcggctctct	gctgaggctcGAAAgcgtggggag
E. faecalis		gctgaggctcGAAAgcgtggggag
N. meningitidis		gtteatgcocGAAAgcgtgggtag
E. coli		gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Enterobacter spec.		gctcaggtgcGAAAgcgtggggag
Proteus spec.		gctcaggtgcGAAAgcgtggggac
P.aeruginosa		actgaggtgcGAAAgcgtggggag
P. fluorescens		actgaggtgcGAAAgcgtggggag
P. mendocina		actgaggtgcGAAAgcgtggggag
P. syringae		actgaggtgcGAAAgcgtggggag
H. influenzae		gctcatgtgtGAAAgcgtggggag
H.ducreyi		gctcatgtgcGAAAgcgtggggag
Bacteroides spec.		actgatgctcGAAAgtgtgggtat

Region in E. coli 16S rRNA	845-875	895-925
S. aureus		ccgcaaggtt GAAA ctcaaaggaa
S. epidermidis		ccgcaaggttGAAActcaaaggaa
S. pneumoniae		ccgcaaggtt GAAA ctcaaaggaa
S. pyogenes		ccgcaaggtt GAAA ctcaaaggaa
E. faecalis		ccgcaaggtt GAAA ctcaaaggaa
N. meningitidis	gctaacgcgtGAAAttgaccgcct	
E. coli		
Enterobacter spec.		
Proteus spec.		
P.aeruginosa		
P. fluorescens		
P. mendocina		
P. syringae		
H. influenzae		
H.ducreyi		
Bacteroides spec.		CBBCaaCBBtGAAActcaaaggaa

A Section

Region in E. coli 16S rRNA	1065-1095	1245-1275
S. aureus		aaagggcagcGAAAccgcgaggtc
S. epidermidis		aaagggtagcGAAAccgcgaggtc
S. pneumoniae		
S. pyogenes		
E. faecalis		
N. meningitidis		
E. coli	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	
Enterobacter spec.	ctcgtgttgtGAAAtgttgggtta	
Proteus spec.	tcgttgttgtGAAAtgttgggtta	
P.aeruginosa		
P. fluorescens		
P. mendocina		
P. syringae		
H. influenzae	ctcgtgttgtGAAAtgttgggttn	gcgaatctcaGAAAgtgcatctsa
H.ducreyi	ctcgtgttgtGAAAtgttgggttn	
Bacteroides spec.		

Region in E. coli 16S rRNA	1400-1430
S. aureus	
S. epidermidis	
S. pneumoniae	
S. pyogenes	
E. faecalis	
N. meningitidis	
E. coli	
Enterobacter spec.	
Proteus spec.	
P.aeruginosa	
P. fluorescens	
P. mendocina	
P. syringae	
H. influenzae	
H.ducreyi	
Bacteroides spec.	gastascgtgGAAAcatgttagcc

WO 00/58505 PCT/EP99/07127

- 24 -

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

Beschreibung der Figuren:

5

Fig. 1: Allgemeines Schema der NASBA® kombiniert mit Ribozymen zur Echtzeitdetektion.

Ribozym-Motiv innerhalb eines der zwei Primer. Es ist nur eine Möglichkeit gezeigt, bei der sich das Ribozym-Motiv am 3'-Ende der amplifizierten RNA befindet. Die RNA Substrat-Sonde ist mit einem Fluorezenzfarbstoffen markiert, dem Reporter (Kreis) und einem Quencher (Dreieck). In der intakten Sonde führt die effiziente Wechselwirkung beider Labels zum "FRET" or Quenching, d.h. zu keinem (or nur sehr schwachem) Reporter-Signal (leerer Kreis). Das Ribozym spaltet viele Sonden-Moleküle. In der gespaltenen Sonde werden beide Labels getrennt, und es wird ein starkes Reporter-Signal erzeugt (gefüllte Kreise).

Fig. 2: A: Allgemeine Struktur von Hammerkopf-Ribozymen. Es sind nur konservierte Nukleotide mit entsprechenden Buchstaben bezeichnet, alle nicht-konservierten Positionen sind mit N angegeben. Die Länge der hybridisierenden Arme können den jeweiligen Erfordernissen angepaßt werden. Drei Orte möglicher Hairpin-Schleifen sind durch gepunktete Linien dargestellt. Die Polarität (5'-3' Richtung) ist nur für den gespaltenen Abschnitt angegeben. B: Entspricht Fig. 2A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

30

Fig. 3: Eine Möglichkeit zur Aufspaltung eines minimalen Ribozyms und einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv wurde auf GAAA verkürzt.

- 25 **-**

WO 00/58505 PCT/EP99/07127

Fig. 4: A: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher (einige wenige Möglichkeiten sind unten angegeben) an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden. B: Entspricht Fig. 4A, wobei die Positionen, an denen vorzugsweise Ribonukleotide eingesetzt werden mit dem Präfix "r" versehen sind, die übrigen Nukleotide können jeweils entweder Ribo- oder Desoxyribonukleotide sein.

10

Fig. 5: Eine weitere Möglichkeit zur Aufspaltung einer Nukleinsäure-Substrat-Sonde. Das konservierte Ribozym-Motiv ist auf CUGA-N-GA reduziert.

15 Fig. 6: Basierend auf der in Fig. 5 dargestellten Möglichkeit ist eine amplifizierte Nukleinsäure (dicke Linie) mit dem minimalen Ribozym-Motiv gezeigt. Die Nukleinsäure Substrat-Sonde enthält Reporter und Quencher an beiden Enden, sie können aber auch mit anderen Positionen verknüpft werden (vgl. Fig. 4).

20

Fig. 7: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge des Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 8: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit 30 enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

PCT/EP99/07127

- 26 -

WO 00/58505

Fig. 9: Basierend auf der in Fig. 3 dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung, gefolgt von einem sehr kurzen 3'-terminalen basengepaarten Abschnitt. Wie gezeigt ist, kann dieser Abschnitt mit dem Ribozym-Motiv überlappen, und die Ausbuchtung kann so kurz sein, daß sie nur ein Nukleotid umfaßt. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaarbildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 10: Basierend auf der in Fig. 2B dargestellten Möglichkeit enthält der reverse Primer das Ribozym-Motiv in einer Ausbuchtung gefolgt von einer einzigen rA-T Basenpaarung mit der Target-Sequenz. Oben ist das Hybrid zwischen primärer Target-Nukleinsäure und Primer gezeigt. Die Position innerhalb der Target-Nukleinsäure und die Länge beider Basenpaar-bildenden Streches kann variieren. Die resultierende amplifizierte Nukleinsäure mit dem vollständigen Ribozym-Motiv ist unten gezeigt.

Fig. 11: Entspricht der in Fig. 10 dargestellten Möglichkeit. Hier enthält die Target-Sequenz jedoch bereits einen längeren Stretch des Ribozym-Motivs (oder, wie gezeigt, des vollständigen 25 Motivs).

Fig. 12: Beispielhafte Struktur enes DNAzyms (= katalytische DNA). Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rA vorhanden sein.

Fig. 13: Beispielhafte Struktur eines weiteren DNAzyms. Das Substrat kann entweder vollständig RNA sein, oder es muß ein Minimum an rRry vorhanden sein.

30

WO 00/58505 PCT/EP99/07127

- 27 -

Fig. 14: Entspricht Fig. 10, wobei der Primer den überwiegenden Teil des NAzym-Motivs (des katalytischen Nukleinsäure-Motivs) enthält und nur die zwei letzten Nukleotide fehlen. Gezeigt ist hier eine Möglichkeit basierend auf "Prototyp A". Für "Prototyp B" ermöglicht das Vorliegen längerer Motive (z.B. TCGTTG statt TCGT) ein deletierteres Motiv im Primer einzusetzen, wobei das 3'-terminale ACGA im elongierten Primer durch die Target-Sequenz geliefert wird.

10 Fig. 15: Beispiel für eine universelle Ribozym-Sonde.

Fig. 16: Beispiel für eine HIV Ribozym-Sonde.

15

BEISPIELE

20 Material:

Die im Rahmen der Erfindung eingesetzten Primer und Sonden sind auf dem Fachmann geläufigem Wege erhältlich, wie z.B. durch Oligonukleotidsynthese.

25

30

Beispiel 1

 ${\tt NASBA}^{\it B}{\tt -Reaktion}$ in Kombination mit Ribozym-abhängiger Detektion:

Alle Enzyme waren komerziell von Pharmacia erhältlich, ausgenommen AMV-Reverse Transkriptase, die von Seikagaku bezogen wurde.

35 $23\mu l$ NASBA Reaktionsmischung, davon 5 μl aus der Aufreinigung nach Boom et al. (J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503) (finale

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91) ISA / EP

Konzentration in 25 μl Reaktionsmischung: 40 mM Tris, pH 8,5, 12 mM MgCl₂, 42 mM KCl, 15 % v/v DMSO, 1 mM jedes dNTP, 2 mM jedes NTP, 0,2 μM Primer 1, 0,2 μM Primer 2 und 0,1-0,5 μM SubstratSonde) wurden bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert um eine Destabilisation der Sekundärstrukturen in der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde für das Primer-Annealing auf 41 °C abgekühlt. Die Amplifikation wurde durch Zugabe von 2 μl Enzym-Mischung (0,1 μg/μl BSA, 0,1 Einheiten RNase H, 40 Einheiten T7 RNA Polymerase und 8 Einheiten AMV Reverse Transkriptase) gestartet. Die Reaktion wurde bei 41 °C für 90 Minuten inkubiert. Während der Reaktion wurden die Fluoreszenzsignale im ABI Prism 7700 Sequence Detector gemessen. Als Reporter/Quencher wurde die Kombination FAM/TAMRA eingesetzt.

15 Experiment A:

(dNTP = Großbuchstaben; rNTP = Kleinbuchstaben)

Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC

TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-GAA TCT CAT CAG TAG CGA GTG GGG GGA CAT CAA GCA
GCC ATG CAA A-3'

25 Substrat A: 5'-TAMRA-Tga auc gaa acg cga aag cgu cua gcg u-FAM-3'

Experiment B:

30 Primer 1: 5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GTG CTA TGT CAC TTC CCC TTG GTT CTC TCA-3'

Primer 2: 5'-ACG TAG TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGC GTG CAG
TGG GGG GAC ATC AAG CAG CCA TGC AAA-3'

35
Substrat B: 5'-TAMRA-Tac gua guc cgu gcu-FAM-3'

Quantifizierung:

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe 5 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

10 Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)

Technik möglich ist.

- Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
- O3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
- O4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)
- Die Experimente A und B führten zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 15 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 x Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 20, 24 und 26 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca. t = 18 und t = 23 Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 200 000 (t = 18) bzw. 15 000 (t = 23). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene

30

Beispiel 2

Universelle Erkennung beliebiger (full-size) amplifizierter RNA-35 Targets (ribozyme motive in reverse primer). Die entsprechende "Universelle Ribozym-Sonde" wurde dem NASBA®-Amplifikationskit zugesetzt.

An seinem 3'-Ende enthält der reverse Primer die übliche Targetspecifische Sequenz (N) und zusätzlich an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die für das allgemeine universelle Ribozym-Motiv codiert:
5'-GCG TTT CGA TTC CNN NNN N...

Das Transcript endet mit der Sequenz 5'-...N NNN NNG GAA UCG AAA CGC

10

Die Ribozym-Sonde wies folgende Sequenz auf:
5'-GCG UC - U AGC GGA AAC GCU ACU GAX GAG AUU CC (32-mer)
- Spaltungsort

15 Zwei Farbstoffe, 5'-Q and 3'-R (oder 3'-Q und 5'-R) waren mit den Enden verknüpft.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, 20 in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

Q1 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)

25 Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)

Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)

Q4 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 2 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 12 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 x Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 18, 22 und 25 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekann-

ten Proben erreichten nach ca. t = 18 und t = 23 Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 100 000 (t = 18) bzw. 8000 (t = 23). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

Diese Beispiel-Sonde kann an einem oder beiden Enden durch mehr 10 Basen-gepaarte Nukleotide verlängert sein.

Beispiel 3

15 Spezifische Erkennung einer amplifizierten Target Sequenz: proximal zu einem der Primer.

Das vorliegende spezifische Beispiele anhand einer NASBA[®]-gestützten Detektion von HIV (entspr. USP 5,837,501) durch-20 geführt.

Amplifiziertes Segment der HIV-RNA:

aqtqqqqqacatcaaqcaqctatqcaaa(c,t)gttaaaagatactatcaatgaggaagctgcagaatgggacagggtacatccagtacatgcagggcctattccaccaggccagatqaqaqaaccaaqqqqaaqtqacataqca

Der Vorwärtsprimer zur Einführung der T7 Promotor-Sequenz (Großbuchstaben) and 1 Punktmutation (fettgedruckter Großbuch-35 stabe):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGG<u>aqtqqqqqqacatcaaqcaqctatqGaaa</u>

- 32 -

Das Transkriptionsprodukt enthält das GAAA Ribozym-Motiv, das mit der proximalen HIV-spezifischen Sequenz verknüpft ist:

GGGaqcaqctatqGaaa(c,t) gttaaaaga....

5 Es kann insbesondere mit der komplementären Ribozym-Sonde, entsprechend dem allgemeinen Versuchsprotokoll durchgefährt werden.

Zur quantitativen Bestimmung der HIV-RNA wurden 4 externe 10 Kontrollen und 2 unbekannte Proben sowie 2 negative Kontrollen, in die oben beschriebene Amplifikation eingesetzt. Mittels der Standards wurde eine Eichkurve erstellt, die Konzentration der Standards betrug:

- 15 01 ca. 1 000 000 Moleküle (RNA)
 - Q2 ca. 100 000 Moleküle (RNA)
 - Q3 ca. 10 000 Moleküle (RNA)
 - 04 ca. 1 000 Moleküle (RNA)

Das Experiment in Beispiel 3 führte zu folgendem Ergebnis: Die im ABI PRISM 7700 gemessene Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs FAM, nahm entsprechend der eingesetzten Menge an Target-Molekül (RNA) zu. Es zeigte sich, daß nach t = 22 Minuten bei der höchsten eingesetzten Standard-Molekül-Menge der Schwellenwert für ein definiert positives Signal erreicht wurde (5 x Std.dev. des Backgrounds). Die weiteren Standards erreichten nach t = 24, 28 und 33 Minuten den entsprechenden Schwellenwert. Die unbekannten Proben erreichten nach ca. t = 18 und t = 23 Minuten ihren Schwellenwert. Anhand der mittels der Standards erstellten 20 Eichkurve ergab sich für die unbekannten Proben eine Molekülmenge von ca. 400 000 (t = 23) bzw. 10 000 (t = 28). Die Negativkontrollen erreichten den Schwellenwert nicht. Dies zeigt, daß eine Quantifizierung von Targetmolekülen durch die hier beschriebene Technik möglich ist.

PCT/EP99/07127

WO 00/58505 - 33 -

Beispiel 4

A. GAAA in rRNA-Abschnitten zur spezifischen Detektion von Bakterien-Spezies.

5

In den obigen Tabellen sind die wichtigsten, durch Lebensmittel übertragene Pathogene aufgeführt.

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert) liegen zwischen den

10 Positionen 110 and 700 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor. Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: 110f and 700r [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt

and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].

15

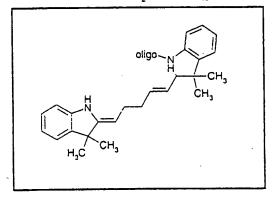
B. Spezifischen Detektion von Sepsis-Erregern.

In den obigen Tabellen sind ferner die wichtigsten Sepsis-Erreger aufgeführt. 20

Einzigartige Sequenzmotive (schattiert), die erfindungsgemäß ausgenutzt werden können liegen zwischen den Positionen 110 and 530 (gemäß E. coli Numerierungssystem) vor.

- 25 Hoch-konservierte Primer zur 16S rRNA-Amplifikation sind bekannt: [Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. (New York: Willey), pp. 115-175].
- 30 Die in der 16S rRNA enthaltenen Sequenzmotive können für die erfidungsgemäßen Verfahren ausgenutzt werden, so daß im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Verfahren zum Nachweis von Erregern, insbesondere von Sepsis-Erregern und Lebensmittelkeimen, und dafür vorgesehene Kits zur Verfügung gestellt werden.

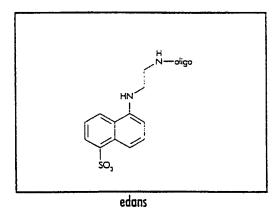
Tab. III: Als Reporter/Quencher geeignete Farbstoffe

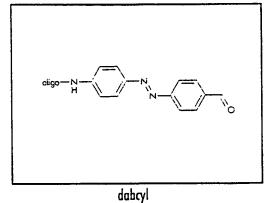


 $$CY_{5}$$ $\lambda_{max,A}$: 651 nm $\lambda_{max,E}$: 674 nm

Texas Red $\lambda_{\text{max},A}\text{: 583 nm }\lambda_{\text{max},E}\text{: 603 nm}$

JOE λ_{max,A}: 527 nm λ_{max,E}: 548 nm





λ_{max,A}: 336 nm λ_{max,E}: 490 nm

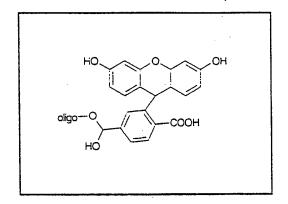
λ_{max,A}: 453 nm

CH₃
CH₃
CH₃
CH₃
COOH
oligo

ROX (6-ROX)

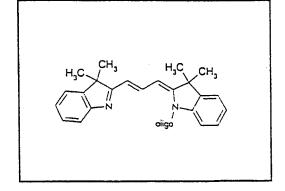
ROX: $\lambda_{max,A}$: 568 nm $\lambda_{max,E}$: 595 nm 6-ROX: $\lambda_{max,A}$: 575 nm $\lambda_{max,E}$: 602 nm

TAMRA $\lambda_{max,A}\text{: 555 nm }\lambda_{max,E}\text{: 580 nm}$



Fluorescein $\lambda_{\text{max},A}\text{: 494 nm }\lambda_{\text{max},E}\text{: 525 nm}$

 $_{6}$ - FAM $_{\lambda_{max,A}:~492~nm}$ $\lambda_{max,E}:$ 515 nm



rhodamine 6G $\lambda_{max,A}\text{: 518 nm }\lambda_{max,E}\text{: 543 nm}$

 $CY_{3} \\ \lambda_{\text{max,A}}: 552 \text{ nm } \lambda_{\text{max,F}}: 565 \text{ nm}$

Tab. III (2. Fortsetzung)

A (nm)	E (nm)	Farbstoffe	
349	448	AMCA	
336	490	ADANS	
495	503	BODIPY 493/503	
505	513	BODIPY LF	
494	515	6-FAM, Fluorescein	
496	516	6-OREGON Green 488	
521 518 531 528 527	536 543 545 547 548	TET Rhodamin 6G (6-R6G) BODIPY FL Br2 BODIPY R6G 6-JOE	
535	552	BODIPY 530/550	
535	555	HEX	
552	565	Cy3	
559	569	BODIPY 558/568	
542	574	BODIPY TMR 542/574	
546	579	5-TAMRA	
560	580	NED	
575	602	6-ROX	
583	603	TEXAS Red	
588	616	BODIPY TR 589/617	
630	640	Light Cycler RED 640	
625	640	BODIPY 630/650	
646	660	BODIPY 650/665	
651	674	Cy5	
700 678 685 685 743 787	710 703 705 705 767 807	Light Cycler Red Cy 5.5 IRD 700 La Jolla Blue Cy 7 IRD 41	

A = Absorption E = Emission

Patentansprüche:

- Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) im Transkript kodiert, wobei man
 - die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

wobei

 ${\sf t_P}$ der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

 ${\sf t_{Ref.}}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) einen Primer verwendet, an den eine Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise mit einer Länge von 1 bis 40 Nukleotiden, angehängt ist, der für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) im Transkript kodiert, wobei man
 - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses, vorzugsweise in einer Konzentration von 50 bis 500 nM, einer Nukleinsäure-Sonde, vorzugsweise mit einer Länge von 25 bis 60 Nukleotiden (besonders bevorzugt etwa 50 Nukleotide), die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

$$c_{rel.} = t_P / t_{Ref.}$$

wobei

 t_{P} der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

 $t_{Ref.}$ der für eine Referenz-Nukleinsäure bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Errei-

chen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- Verfahren zur Amplifikation und quantitativen Echtzeitdetektion einer das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv A enthält, amplifiziert wird, wobei man
 - b) die Amplifikationin Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

wobei

 ${\sf t_P}$ der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

 ${\sf t_{Ref.}}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

- 4. Verfahren zur Amplifikation und zum quantitativen Nachweis einer das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthaltenden Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) die Sequenzen der verwendeten Primer so wählt, daß der Sequenzbereich der Nukleinsäure, der Motiv B enthält, amplifiziert wird, wobei man
 - b) die Amplifikation in Gegenwart eines Überschusses einer Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, durchführt, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, und man
 - c) die ursprüngliche Konzentration der Nukleinsäure in der Probe durch Messen der zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz während der Amplifikation bestimmt, wobei man die relative Konzentration »c_{rel.}« nach folgender Formel bestimmt:

 $c_{rel} = t_P / t_{Ref.}$

wobei

 ${\sf t_P}$ der für die Probe ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht und

 ${\sf t_{Ref.}}$ der für eine Referenz-RNA bekannter Konzentration ab Beginn der Amplifikation bis zum Erreichen des Fluoreszenz-Schwellenwerts gemessenen Zeit entspricht.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.

- 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-
- 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
- 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
- 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
- 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA[®], TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
- 11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
- 12. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.

1.5

- 13. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) enthalten, bei dem man eine die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einer Sonde in Kontakt bringt, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, wobei die Sonde eine zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz aufweist.
- 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
- 15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
- 16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.
- 17. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reporter einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und als Quencher einen Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR verwendet.
- 18. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' im Transkript kodiert,
 - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
 - c) Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,#

226,734 (12.54)

- d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
- e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

- 19. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - einen Amplifikationsprimer, an den eine Nukleinsäure-Sequenz angehängt ist, die für das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' im Transkript kodiert,
 - b) einen weiteren Amplifikationsprimer,
 - Enzyme und Reagenzien zur Durchführung der Amplifikation,
 - d) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
 - e) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

umfaßt.

- 20. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - a) zwei Amplifikationsprimer,
 - b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
 - c) eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'CUGANGA-3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein
 Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt
 sind, sowie gegebenenfalls

d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

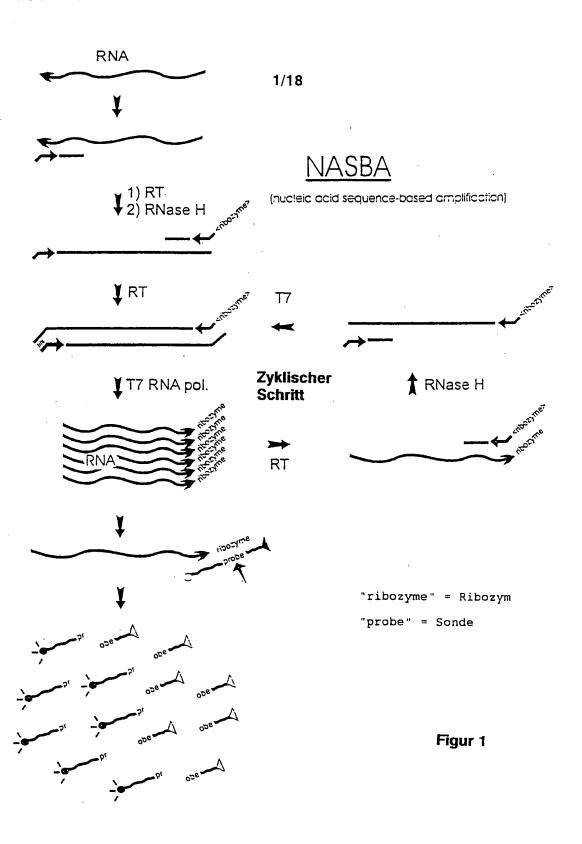
umfaßt.

- 21. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - a) zwei Amplifikationsprimer,
 - b) Enzyme zur Durchführung der Amplifikation,
 - eine Nukleinsäure-Sonde, die das Sequenzmotiv 5'-GAAA3' enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein ReporterMolekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls
 - d) für die Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel

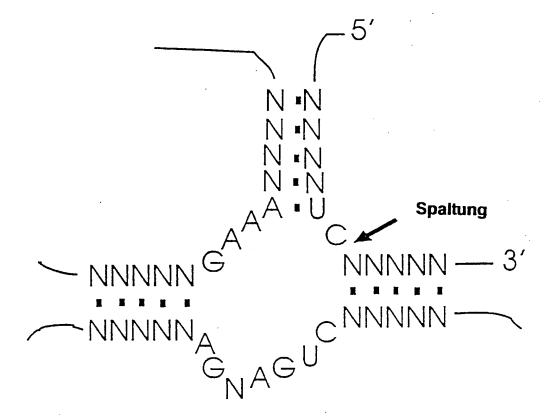
umfaßt.

- 22. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure RNA, DNA oder ein DNA/RNA-Chimär ist.
- 23. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die an den Primer angehängte Nukleinsäure-Sequenz eine Länge von 1 bis 40 Nukleotiden aufweist.
- 24. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure-Sonde in einer Konzentration von 50 bis 500 nM einsetzt.
- 25. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure-Sonde eine Länge von 25 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise etwa 50 Nukleotide, hat.

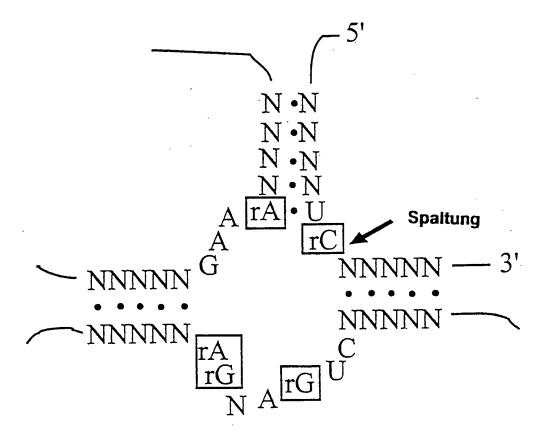
- 26. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren eine isothermes oder cyclisches Amplifikationsverfahren ist.
- 27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsverfahren aus der Gruppe bestehend aus NASBA[®], TMA, 3SR, oder PCR ausgewählt ist.
- 28. Kit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kit zur Durchführung einer NASBA® ist, wobei die Enzyme die Aktivität von Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H aufweisen.
- 29. Kit nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Enzyme zur Durchführung der NASBA[®] Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und RNase H sind.
- 30. Kit zur Durchführung des Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sonde mit einer zur Hybridisierung mit der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignete Sequenz, die das Sequenzmotiv 5'-CUGANGA-3' (Motiv B) oder 5'-GAAA-3' (Motiv A) enthält, wobei an jedes Sondenmolekül ein Reporter-Molekül und ein Quencher-Molekül angehängt sind, sowie gegebenenfalls weitere zur Durchführung der Reaktion erforderliche Geräte und Hilfsmittel umfaßt.
- 31. Kit nach den Ansprüchen 18 bis 30, dadurch gekennzeichnet, der Reporter ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus FAM, HEX, TET, ALEXA, Texas Red, Light Cycler Red, IRD 700, CY-7, IRD 41 oder La Jolla Blue und der Quencher ein Farbstoff aus der Gruppe bestehend aus TAMRA, CY-5, DABCYL, und LCR ist.



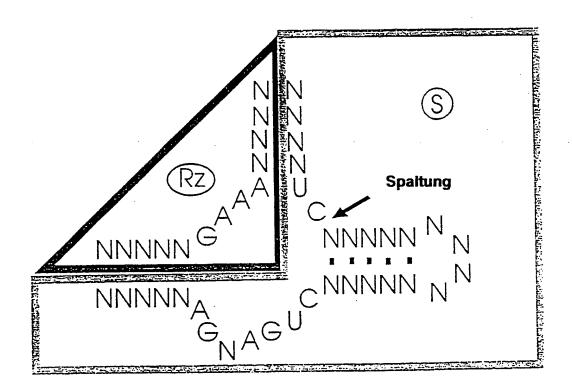
Figur 2A



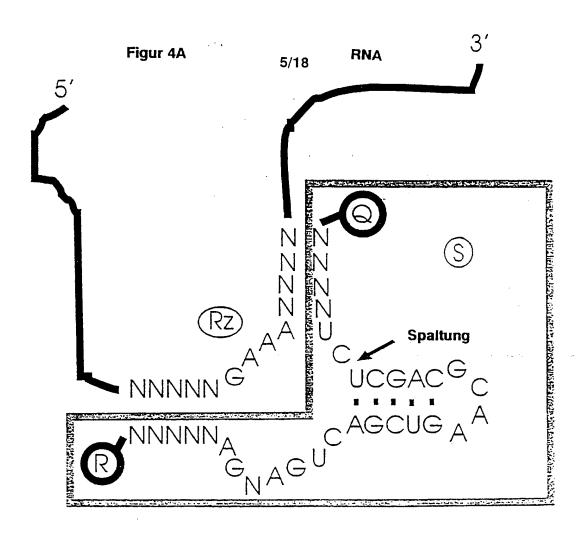
Figur 2B



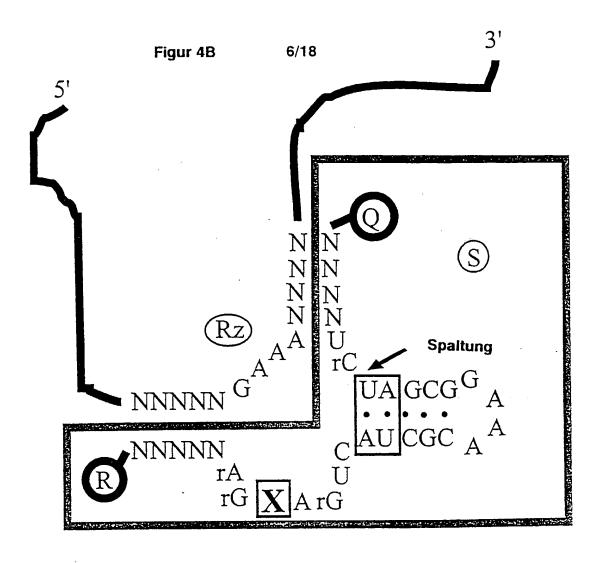
Figur 3



PCT/EP99/07127



$$R = FAM$$
 HEX
 $CY-5$
 TET
 $ALEXA$
 $CY-6$
 $CY-5$
 $CY-5$



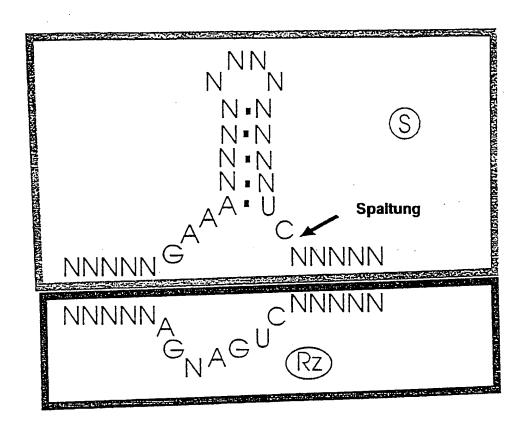
X = Pyridin-4-on

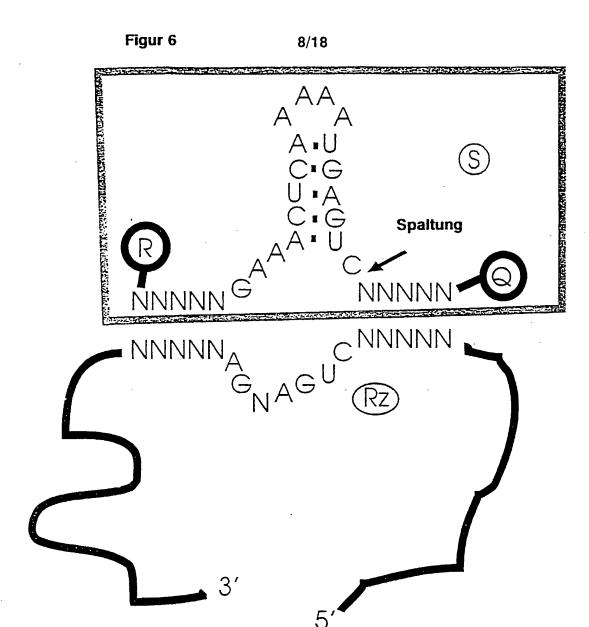
r = ss nti lle Ribonukl otide

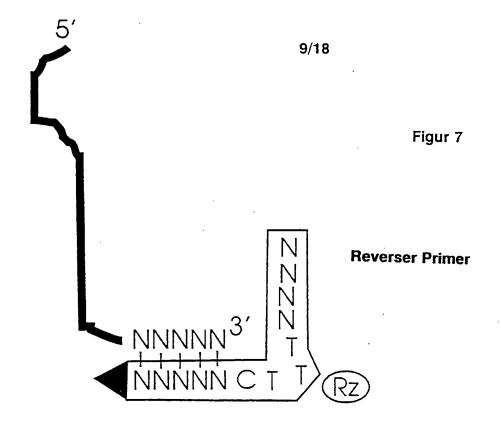
wichtig: k ine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

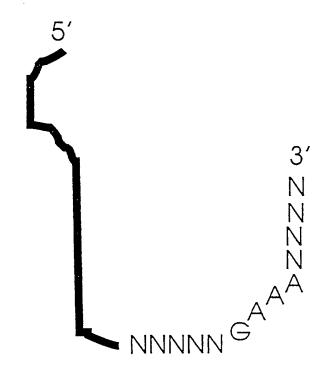
7/18

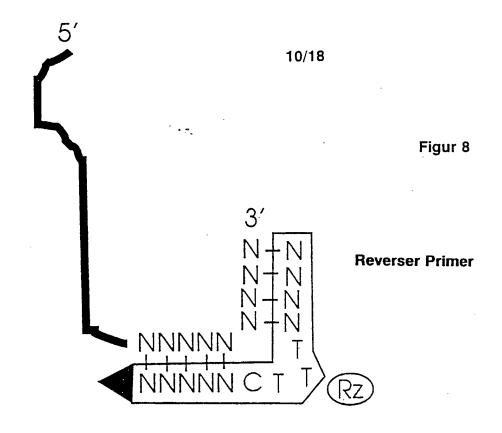
Figur 5

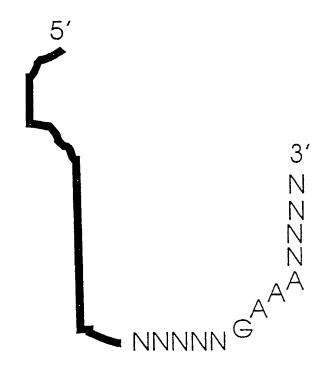


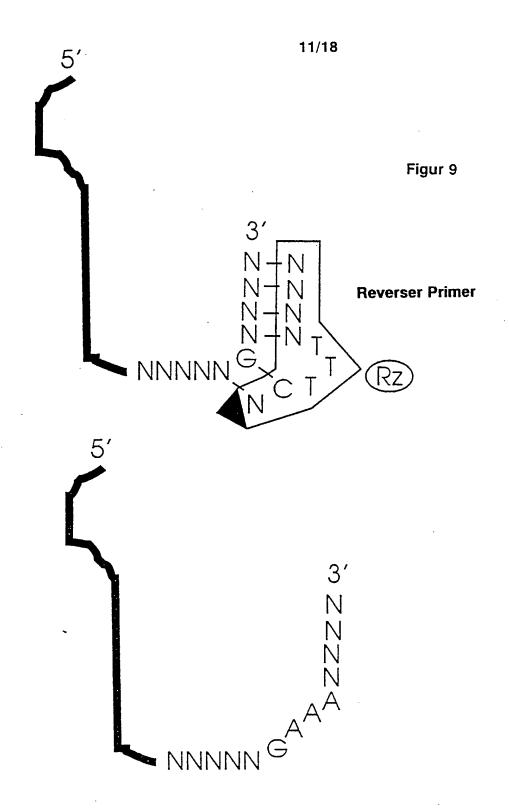




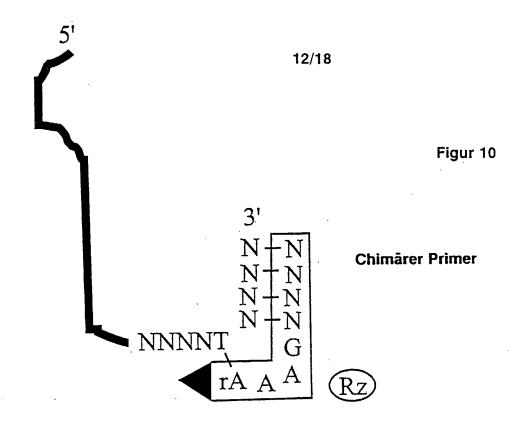


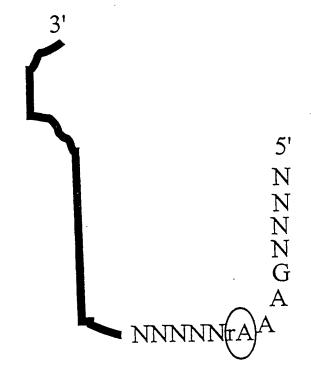


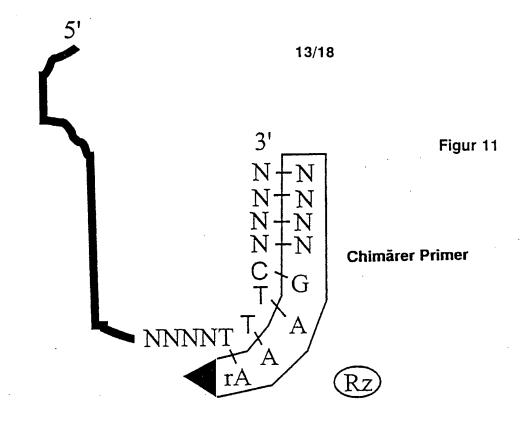


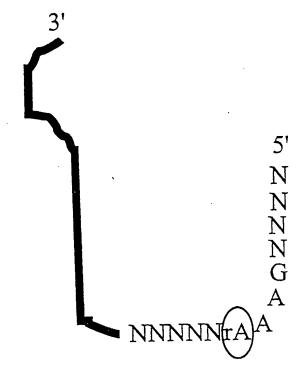


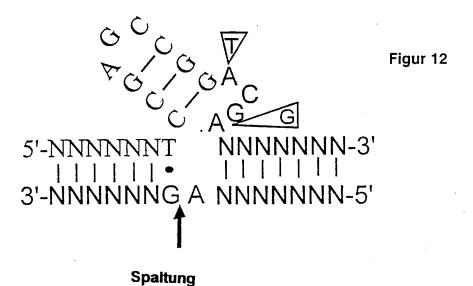
ERSATZBLATT (REGEL 26)



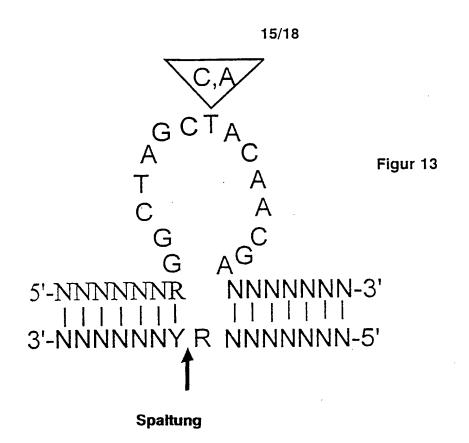




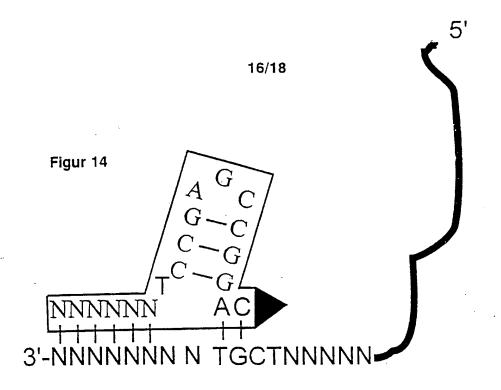


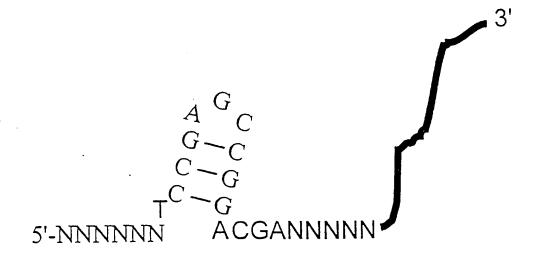


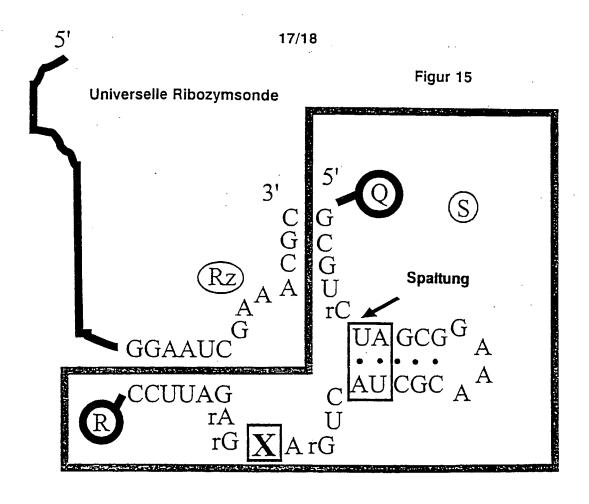
DNA-zyme: Protype A



DNA-zyme: Protype B





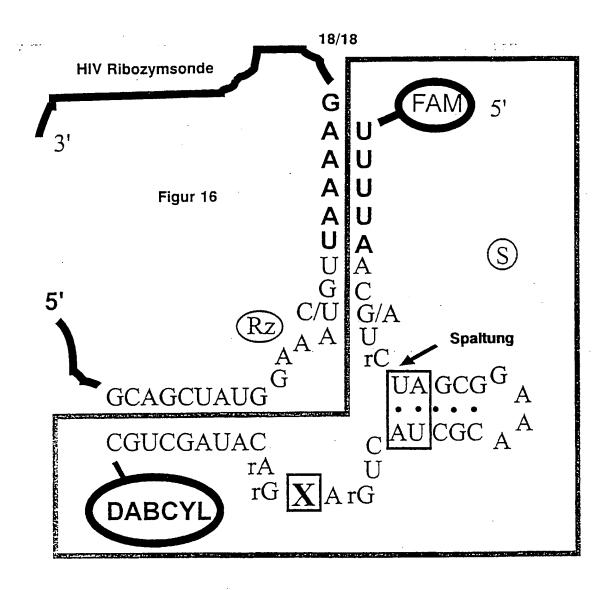


$$R = FAM$$
 $Q = TAMRA$ $CY-5$ TET $DABCYL$ LCR etc.

X = Pyridin-4-on

r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: k in (C,U)-A Dinukleotid im Loop



X = Pyridin-4-on

r = essentielle Ribonukleotide

wichtig: keine (C,U)-A Dinukleotide im Loop

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte .donal Application No PCT/EP 99/07127

			,
A. CLASSI IPC 7	ification of subject matter C12Q1/68		
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national classific	ation and IPC	
B. FIELDS	SEARCHED		
Minimum do IPC 7	ocumentation searched (classification system followed by classification ${\tt C12Q}$.	on symbols)	
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent that s	uch documents are include	ed in the fields searched
Electronic d	lata base consulted during the international search (name of data bas	se and, where practical, s	earch terms used)
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the reli	evant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOO YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FR 6 September 1996 (1996-09-06) the whole document		1-31
Y	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London AN 96-419828 XP002111692 & JP 08 205897 A (NIKKON CORP), 13 August 1996 (1996-08-13) abstract	n, GB;	1-31
Y	WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29 November 1990 (1990-11-29) the whole document	-/	1-31
X Furti	her documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family me	embers are listed in annex.
"A" docume consid "E" earlier of filing d "L" docume which citation "O" docume other r "P" docume later th	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is clied to establish the publication date of another in or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means ant published prior to the international filing date but man the priority date claimed	or priority date and n cited to understand t invention "X" document of particula cannot be considere involve an inventive and the considere document of particula cannot be considere document is combine ments, such combine in the art. "&" document member of	
	actual completion of the international search		e international search report
	9 March 2000	07/04/20	UU
Name and n	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,	Authorized officer Hagenmai	er. S

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte donal Application No PCT/EP 99/07127

NNE A ET AL: "Fluoresecence energy ansfer (FRET) to follow ribozyme actions in real time" CLEOSIDES & NUCLEOTIDES, US, MARCEL KKER, INC, 1. 17, no. 9/11, 1998, pages 35-1850-1850, XP002111690 SSN: 0732-8311 e whole document 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) June 1994 (1994-06-23) e whole document 0 525 882 A (AKZO NV) February 1993 (1993-02-03) e claim 6 e whole document ONE ET AL: "MOLECULAR BEACON PROBES MBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF A"	Relevant to claim No.
ansfer (FRET) to follow ribozyme actions in real time" CLEOSIDES & NUCLEOTIDES,US,MARCEL KKER, INC, 1. 17, no. 9/11, 1998, pages 35-1850-1850, XP002111690 SSN: 0732-8311 e whole document 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) June 1994 (1994-06-23) e whole document 0 525 882 A (AKZO NV) February 1993 (1993-02-03) e claim 6 e whole document ONE ET AL: "MOLECULAR BEACON PROBES MBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF	1-31
June 1994 (1994-06-23) e whole document 0 525 882 A (AKZO NV) February 1993 (1993-02-03) e claim 6 e whole document DNE ET AL: "MOLECULAR BEACON PROBES MBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF	
February 1993 (1993-02-03) e claim 6 e whole document DNE ET AL.: "MOLECULAR BEACON PROBES MBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF A"	
MBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF A"	
CLEIC ACIDS RESEARCH, 1. 26, no. 9, 1998, pages 2150-2155, 002134179 e whole document	
0 707 076 A (AMOCO CORP) April 1996 (1996-04-17) e whole document	
96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST OYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R S)) 6 June 1996 (1996-06-06) e whole document	
99 47704 A (JENNE ANDREAS ;FAMULOK CHAEL (DE)) September 1999 (1999-09-23) e whole document	1-31
NNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF BOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY ANSFER (FRET)" GEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL ITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, 1. 38, no. 9, 3 May 1999 (1999-05-03), ges 1300-1303-1303, XP002111691 SSN: 0570-0833 e whole document	1-31
	April 1996 (1996-04-17) e whole document 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST DYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R S)) 6 June 1996 (1996-06-06) e whole document 99 47704 A (JENNE ANDREAS ;FAMULOK CHAEL (DE)) September 1999 (1999-09-23) e whole document NNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF BOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY ANSFER (FRET)" GEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL ITION,DE,VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, 1. 38, no. 9, 3 May 1999 (1999-05-03), ges 1300-1303-1303, XP002111691 SSN: 0570-0833

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intellional Application No
PCT/EP 99/07127

	atent document d in search report		Publication date		atent family member(s)		Publication date
WO	9627026	A	06-09-1996	IL AU BR CA CN EP JP NO	112799 697317 5416596 9607267 2213622 1183812 0822992 11500917 973926	B A A A A A T	12-03-1999 01-10-1998 18-09-1996 15-12-1998 06-09-1996 03-06-1998 11-02-1998 26-01-1999 08-10-1997
JP	8205897	Α	13-08-1996	NONE			
WO	9014439	Α	29-11-1990	US AU DE DE EP JP	5112734 5674590 69018631 69018631 0473693 4506748	A D T A	12-05-1992 18-12-1990 18-05-1995 10-08-1995 11-03-1992 26-11-1992
WO	9413833	Α	23-06-1994	AU AU EP JP US	675482 5739694 0681613 8507202 5589332	A A T	06-02-1997 04-07-1994 15-11-1995 06-08-1996 31-12-1996
EP	0525882	Α	03-02-1993	AU AU CA FI JP US ZA	670535 2071892 2075147 923447 5219999 5834255 9205631	A A A A	25-07-1996 11-03-1993 03-02-1993 03-02-1993 31-08-1993 10-11-1998 28-04-1993
EP	0707076	Á	17-04-1996	DE DE EP JP US US	68926484 68926484 0361983 2257898 5763171 5472840	T A A A	20-06-1996 05-12-1996 04-04-1990 18-10-1990 09-06-1998 05-12-1995
WO	9617086	A	06-06-1996	US AU AU BR CA CN EP FI HU JP	5807718 710747 4595096 9510003 2205382 1173207 0792375 972333 77576 10510165 972483	B A A A A A A T	15-09-1998 30-09-1999 19-06-1996 21-10-1997 06-06-1996 11-02-1998 03-09-1997 31-07-1997 29-06-1998 06-10-1998 04-08-1998
WO	9947704	Α	23-09-1999	NONE			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte Jonales Aktenzeicher
PCT/EP 99/07127

	IFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 7	C12Q1/68		
Nach der In	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	sifikation und der IPK	
8. RECHE	RCHIERTE GEBIETE		
Recherchie IPK 7	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo	le)	•
11/6 /	C12Q	•	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultlerte elektronische Datenbank (N.	ame der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegriffe)
		•	
C. ALS WI	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Υ	WO 96 27026 A (KRUPP GUIDO ;TIKOC		1-31
	YARON (IL); ASHER NATHAN (IL); FR 6. September 1996 (1996-09-06)	IEDMANN)	·
	das ganze Dokument		
Υ	DATABASE WPI		1-31
	Derwent Publications Ltd., London	, GB;	
	AN 96-419828 XP002111692	•	
	& JP 08 205897 A (NIKKON CORP),		
	13. August 1996 (1996-08-13)		
	Zusammenfassung		
,			1 21
Y	WO 90 14439 A (GENE TRAK SYSTEMS) 29. November 1990 (1990-11-29)		1-31
	das ganze Dokument		
l	<u>-</u>	/	
			<u> </u>
	ilere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
4		"T" Spätere Veröffentlichung, die nach den oder dem Prioritätsdatum veröffentlich	t worden list und mit der
aber	entlichung, die den allgemeinen Stand-der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu Erfindung zugrundellegenden Prinzips	r zum Verständnis des der
	Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen aldedatum veröffentlicht worden ist	Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bede	-
schai	entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	kann allein aufgrund dieser Veröffentti	chung nicht als neu oder auf
ande	ren im Recherchembericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bede	utung; die beanspruchte Erfindung
ausge	eführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,	kann nicht als auf erfinderischer Tätigi werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in	einer oder mehreren anderen
eine f	Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	diese Verbindung für einen Fachmann	nahellegend ist
dem	beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselber	<u>. </u>
Datum des	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cnerchenberichts
;	29. März 2000	07/04/2000	
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2	Bevollmächtigter Bediensteter	
{	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni,	llagoometer C	
l	Fay: (+31-70) 340-3016	Hagenmaier, S	

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ints ionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07127

		PCI/EP 9	737-07 127
	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie'	Bezeichnung der Verölfentlichung, soweil erforderlich unter Angabe der in Betracht kommen	iden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HANNE A ET AL: "Fluoresecence energy transfer (FRET) to follow ribozyme reactions in real time" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES,US,MARCEL DEKKER, INC, Bd. 17, Nr. 9/11, 1998, Seiten 1835-1850-1850, XP002111690 ISSN: 0732-8311 das ganze Dokument		1-31
A	WO 94 13833 A (INNOVIR LAB INC) 23. Juni 1994 (1994-06-23) das ganze Dokument	•	
Α	EP 0 525 882 A (AKZO NV) 3. Februar 1993 (1993-02-03) See claim 6 das ganze Dokument		
А	LEONE ET AL.: "MOLECULAR BEACON PROBES COMBINED WITH AMPLIFICATION BY NASBA ENABLE HOMOGENEOUS, REAL-TIME DETECTION OF RNA"		
	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 9, 1998, Seiten 2150-2155, XP002134179 das ganze Dokument		
A	EP 0 707 076 A (AMOCO CORP) 17. April 1996 (1996-04-17) das ganze Dokument	·	
Α	WO 96 17086 A (SCRIPPS RESEARCH INST; JOYCE GERALD F (US); BREAKER RONALD R (US)) 6. Juni 1996 (1996-06-06) das ganze Dokument		
Ρ,Χ	WO 99 47704 A (JENNE ANDREAS ;FAMULOK MICHAEL (DE)) 23. September 1999 (1999-09-23) das ganze Dokument		1-31
P,X	JENNE A: "REAL-TIME CHARACTERIZATION OF RIBOZYMES BY FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 38, Nr. 9, 3. Mai 1999 (1999-05-03), Seiten 1300-1303-1303, XP002111691 ISSN: 0570-0833 das ganze Dokument		1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamille gehören

Ints Jonales Aktenzeichen
PCT/EP 99/07127

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9627026 A	06-09-1996	IL 112799 A AU 697317 B AU 5416596 A BR 9607267 A CA 2213622 A CN 1183812 A EP 0822992 A JP 11500917 T NO 973926 A	12-03-1999 01-10-1998 18-09-1996 15-12-1998 06-09-1996 03-06-1998 11-02-1998 26-01-1999 08-10-1997
JP 8205897 A	13-08-1996	KEINE	
WO 9014439 A	29-11-1990	US 5112734 A AU 5674590 A DE 69018631 D DE 69018631 T EP 0473693 A JP 4506748 T	12-05-1992 18-12-1990 18-05-1995 10-08-1995 11-03-1992 26-11-1992
WO 9413833 A	23-06-1994	AU 675482 B AU 5739694 A EP 0681613 A JP 8507202 T US 5589332 A	06-02-1997 04-07-1994 15-11-1995 06-08-1996 31-12-1996
EP 0525882 A	03-02-1993	AU 670535 B AU 2071892 A CA 2075147 A FI 923447 A JP 5219999 A US 5834255 A ZA 9205631 A	25-07-1996 11-03-1993 03-02-1993 03-02-1993 31-08-1993 10-11-1998 28-04-1993
EP 0707076 A	17-04-1996	DE 68926484 D DE 68926484 T EP 0361983 A JP 2257898 A US 5763171 A US 5472840 A	20-06-1996 05-12-1996 04-04-1990 18-10-1990 09-06-1998 05-12-1995
WO 9617086 A	06-06-1996	US 5807718 A AU 710747 B AU 4595096 A BR 9510003 A CA 2205382 A CN 1173207 A EP 0792375 A FI 972333 A HU 77576 A JP 10510165 T NO 972483 A	15-09-1998 30-09-1999 19-06-1996 21-10-1997 06-06-1996 11-02-1998 03-09-1997 31-07-1997 29-06-1998 06-10-1998
WO 9947704 A	23-09-1999	KEINE	